



Magbead Pathogenic Microbiome DNA/RNA Kit

磁珠法病原微生物DNA/RNA提取试剂盒

目录号：CW3061S

保存条件：室温（15-30℃）

产品内容

Component	CW3061S 96 preps
Buffer LBS-A	50 mL
Buffer WB1	100 mL
Buffer WB2	100 mL
RNase-Free Water	10 mL
Proteinase K	2×1.25 mL
Magbeads PN	2×1 mL
Lysis Tubes	96

产品简介

本试剂盒适用于从血浆、血清、肺泡灌洗液等生物液体样本中纯化和富集病毒、细菌和真菌等病原微生物DNA及RNA。用本试剂盒纯化的微生物DNA及RNA适用于多种下游应用，包括PCR、RT-PCR、荧光定量PCR、NGS等各种下游实验。

自备仪器、试剂

1. 2/15 mL磁力架或32通道核酸提取仪（CWE3200/CWE2100）
2. 异丙醇
3. PBS缓冲液

实验前准备及注意事项

1. 使用前请检查Buffer LBS-A是否出现沉淀，如有沉淀出现，请置于56℃水浴重新溶解。
本试剂盒旨在从完整的微生物细胞中分离DNA及RNA，为了保证微生物DNA及
2. RNA的最佳回收效率，样品应保证新鲜。如果需要储存或运输，最好在2~8℃条件下进行，不可冻融，冻融会损坏微生物细胞的完整性。
为避免由于污染造成的错误结果，请保持工作区域清洁和穿防护服，并合理设置对
3. 照品进行质控。采用适当措施处理样品材料，降低交叉污染的风险。提取过程中，使用DNA/RNA-free的移液器吸头和消耗品，试剂使用完后立即盖好瓶盖，防止污染。

操作步骤

一 手动操作

1. 样本前处理：

1a: 尿液、胸腹水、脑脊液等非粘稠体液样本

直接取400 μ L样本，进行第2步操作。

1b: 拭子类样本（如鼻、咽及肛拭子等）

涡旋振荡混匀后，直接取400 μ L进行第2步实验。

1c: 痰液、肺泡灌洗液样本

取适量液化痰液样本至1.5 mL 离心管中（液化方法推荐使用1.5倍体积的Buffer GB1，本试剂盒不提供），12,000 rpm离心5 min，弃上清，使用400 μ L PBS重悬沉淀后提取。对于含有少量粘稠痰液的肺泡灌洗液，将尽量多的肺泡灌洗液样本先进行离心，小心去除上清，留取下层粘稠部分（含痰液、细胞、菌体）参照痰液样本进行液化处理。

1d: 血液类样本

血清、血浆及少量全血样本（少于200 μ L）可直接取400 μ L（少量全血使用PBS补足）进行第2步实验，大体积全血样本推荐使用红细胞裂解液（CW0613）处理后再进行提取。

可选去宿主步骤（搭配康为世纪宿主DNA去除试剂盒CW3169S）

2. 向Lysis Tubes中加入400 μ L样本和400 μ L Buffer LBS-A，可用以下振荡方式处理：
 - a) 将Lysis Tubes置于室温涡旋振荡10 min；
 - b) 将Lysis Tubes置于恒温混匀仪上以最大振速（2500~2900 rpm）处理10 min；
 - c) 将Lysis Tube 置于样本均质仪中，可根据不同品牌的仪器选择合适的程序进行裂解：如使用MP公司FastPrep-24-5G（6 M/S的速度振荡30 sec，间隔30 sec，共6个循环）。
3. 室温12000 rpm离心1min，转移600 μ L上清至新的离心管中，加20 μ L Proteinase K（若经过去宿主处理，则此步不需再加Proteinase K），涡旋震荡混匀5 s后，置于65 $^{\circ}$ C 600 rpm孵育10 min。
4. 瞬离离心管，确保管壁无液体残留后，在离心管中加入20 μ L Magbeads PN和300 μ L异丙醇，涡旋5 s后，室温，1500 rpm孵育5 min。

注：Magbeads PN使用前，涡旋以保证充分重悬。
5. 瞬离离心管，确保管壁无液体残留后，将离心管置于磁力架上静置2 min或至磁珠完全吸附，用移液器小心吸弃所有上清。
6. 在离心管中，加入500 μ L Buffer WB1，室温，1500 rpm孵育3 min，将离心管置于磁力架上静置2 min或至磁珠完全吸附，用移液器小心吸弃所有上清。
7. 重复步骤6一次。
8. 在离心管中，加入500 μ L Buffer WB2，室温，1500 rpm孵育3 min，将离心管置于磁力架上静置2 min或至磁珠完全吸附，用移液器小心吸弃所有上清。
9. 重复步骤8一次。
10. 离心管放置于磁力架上，敞盖晾干5 min。
11. 在离心管中加入70 μ L RNase-Free Water，用移液器吹打混匀，置于56 $^{\circ}$ C 600 rpm孵育5 min。瞬离离心管后，将离心管置于磁力架上静置2 min或至磁珠完全吸附，用移液器转移所有上清至新离心管中。获得的核酸溶液置于-20 $^{\circ}$ C长期保存。

二 与核酸提取仪CWE3200/CWE2100匹配

1. 样本前处理同手动操作步骤1。
2. 在Lysis Tubes中加入400 μ L样本、400 μ L Buffer LBS-A，室温振荡处理10 min，振荡方法同手动操作步骤2，室温12000 rpm离心1min。

3. 按照下表在96深孔板中分装试剂

位置	试剂	体积
第 1、7 列	异丙醇	300 μ L
第 2、8 列	Buffer WB1	500 μ L
第 3、9 列	Buffer WB1	500 μ L
第 4、10 列	Buffer WB2	500 μ L
第 5、11列	Buffer WB2	500 μ L
第 3、9 列	Magbeads PN	20 μ L
第 6、12 列	RNase-Free Water	70 μ L

4. 在分装好试剂的96深孔板第1、7列中加入600 μ L步骤1中上清样本、20 μ L Proteinase K（若经过去宿主处理，则此步不需再加Proteinase K）。

5. 按照下表编辑并运行提取程序：

步序	磁棒位置	步骤名称	温度	释放磁珠	搅拌速度	时间	循环次数	磁吸次数	磁吸时间
1	1	裂解	65 $^{\circ}$ C	是	中速	10 min	1	0	0
2	3	收集磁珠	0	否	快速	5 s	1	2	10 s
3	1	结合	0	是	中速	5 min	1	2	10 s
4	2	漂洗	0	是	快速	2 min	1	2	10 s
5	3	漂洗	0	是	快速	2 min	1	2	10 s
6	4	漂洗	0	是	快速	2 min	1	2	10 s
7	5	漂洗	0	是	快速	2 min	1	2	10 s
8	5	干燥	0			5 min			
9	6	洗脱	56 $^{\circ}$ C	是	中速	5 min	1	3	10 s
10	3	释放磁珠	0	是	快速	5 s			

6. 程序运行结束后，取出96深孔板，将第6、12列中的洗脱液转移至新离心管中，-20 $^{\circ}$ C长期保存。